

## PRIORITY DOCUMENT

US Patent Application No. 486924

JP-A 59-224564 (1984)

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭59-224564

⑬ Int. Cl.<sup>3</sup>

G 01 N 33/54

C 12 Q 1/00

識別記号

庁内整理番号

A 7906-2 G

8213-4 B

⑬ 公開 昭和59年(1984)12月17日

発明の数 70  
審査請求 未請求

(全 14 頁)

⑭ 生物学的活性もしくは官能性化合物の複合化  
およびその調製およびその利用

⑮ 特 願 昭59-79318

⑯ 出 願 昭59(1984) 4 月19日

優先権主張 ⑰1983年 4 月20日 ⑱米国(US)

⑲486924

⑳ 発 明 者 ケネス・エイチ・ジョンストン  
アメリカ合衆国10014ニュー・ヨーク・ニュー・ヨーク・ホレ  
ーシヨ・ストリート95㉑ 出 願 人 エンゾー・バイオケム, インコ  
ーポレイテッドアメリカ合衆国10013ニュー・  
ヨーク・ニュー・ヨーク・ハド  
ソン・ストリート325

㉒ 代 理 人 弁理士 宇佐見忠男

## 明 細 書

合体を調製する方法。

## 1. 発明の名称

生物学的活性もしくは官能性化合物の複合化お  
よびその調製およびその利用

## 2. 特許請求の範囲

1. 第1の化合物の活性位置が保護されるよう  
な条件下において該第1の化合物を固体基材に  
付着もしくは固定すること、該第1の化合物の  
活性位置が該固体基材に付着および/または  
固定されることによって保護されている間に該  
第1の化合物をある誘導体化化合物で誘導体化  
もしくは結合すること、該固体基材に対して付  
着している得られた複合化された該第1の化合  
物を解放して該複合体を生成すること(該複合  
体は該第1の化合物に結合されている該誘導体  
化合物からなり、該第1の化合物は該固体基  
材から解放した上でその活性位置を利用出来る  
)からなることを特徴とする第1の化合物の複

2. 第1の化合物の活性位置が保護されるよう  
な条件下において該第1の化合物を固体基材に  
付着もしくは固定すること、該第1の化合物の  
活性位置が該固体基材に付着および/または  
固定されることによって保護されている間に該  
第1の化合物をある誘導体化化合物で誘導体化  
もしくは結合すること、得られた誘導体化もし  
くは結合された第1の化合物へ第2の化合物を  
結合すること(該第2の化合物は該第1の化合  
物を誘導体化するために用いられる誘導体化  
化合物に対して特異的に結合する能力を有する)、  
該固体基材に対して付着している得られた複合  
化された該第1の化合物を解放して該複合体を  
生成すること(該複合体は該誘導体化化合物に  
結合している該第2の化合物と、該第1の化合  
物に結合されている該誘導体化する化合物から  
なり、該第1の化合物は該固体基材から解放し  
た上でその活性位置を利用出来る)からなるこ

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭59—224564

⑬ Int. Cl.<sup>3</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和59年(1984)12月17日

G 01 N 33/54

A 7906—2 G

発明の数 70

C 12 Q 1/00

8213—4 B

審査請求 未請求

(全 14 頁)

⑮ 生物学的活性もしくは官能性化合物の複合化  
およびその調製およびその利用

⑯ 特 願 昭59—79318

⑰ 出 願 昭59(1984)4月19日

優先権主張 ⑱ 1983年4月20日 ⑲ 米国(US)  
⑳ 486924

㉑ 発 明 者 ケネス・エイチ・ジョンストン  
アメリカ合衆国10014 ニュー・

ヨーク・ニュー・ヨーク・ホレ  
ーシヨ・ストリート95

㉒ 出 願 人 エンゾー・バイオケム, インコ  
ーポレイテッド

アメリカ合衆国10013 ニュー・  
ヨーク・ニュー・ヨーク・ハド  
ソン・ストリート325

㉓ 代 理 人 弁理士 宇佐見忠男

明 細 書

合体を調製する方法。

1. 発明の名称

生物学的活性もしくは官能性化合物の複合化お  
よびその調製およびその利用

2. 特許請求の範囲

1. 第1の化合物の活性位置が保護されるよう  
な条件下において該第1の化合物を固体基材に  
付着もしくは固定すること、該第1の化合物の  
活性位置が該固体基材に付着および/または  
固定されることによって保護されている間に該  
第1の化合物をある誘導体化化合物で誘導体化  
もしくは結合すること、該固体基材に対して付  
着している得られた複合化された該第1の化合  
物を解放して該複合体を生成すること(該複合  
体は該第1の化合物に結合されている該誘導体  
化化合物からなり、該第1の化合物は該固体基  
材から解放した上でその活性位置を利用出来る  
)からなることを特徴とする第1の化合物の複

2. 第1の化合物の活性位置が保護されるよう  
な条件下において該第1の化合物を固体基材に  
付着もしくは固定すること、該第1の化合物の  
活性位置が該固体基材に付着および/または  
固定されることによって保護されている間に該  
第1の化合物をある誘導体化化合物で誘導体化  
もしくは結合すること、得られた誘導体化もし  
くは結合された第1の化合物へ第2の化合物を  
結合すること(該第2の化合物は該第1の化合  
物を誘導体化するために用いられる誘導体化化  
合物に対して特異的に結合する能力を有する)、  
該固体基材に対して付着している得られた複合  
化された該第1の化合物を解放して該複合体を  
生成すること(該複合体は該誘導体化化合物に  
結合している該第2の化合物と、該第1の化合  
物に結合されている該誘導体化する化合物から  
なり、該第1の化合物は該固体基材から解放し  
た上でその活性位置を利用出来る)からなるこ

とを特徴とする第1の化合物の複合体を調製する方法。

3. 「特許請求の範囲1。」に記載の方法において、該第1の化合物は酵素である。

4. 「特許請求の範囲1。」に記載の方法において、該第1の化合物はホルモンである。

5. 「特許請求の範囲1。」に記載の方法において、該第1の化合物はホルモン受容体である。

6. 「特許請求の範囲1。」に記載の方法において、該第1の化合物は担体もしくはステロイドと結合している蛋白質である。

7. 「特許請求の範囲1。」に記載の方法において、該第1の化合物はレクテンである。

8. 「特許請求の範囲1。」に記載の方法において、該第1の化合物は抗体である。

15. 「特許請求の範囲1。」に記載の方法において、該第1の化合物はグリコシダーゼであり、該誘導体化合物はビオチンであり、該得られた複合体はビオチン化グリコシダーゼである。

16. 「特許請求の範囲2。」に記載の方法において、該第1の化合物は酵素である。

17. 「特許請求の範囲2。」に記載の方法において、該第1の化合物はホルモンである。

18. 「特許請求の範囲2。」に記載の方法において、該第1の化合物はホルモン受容体である。

19. 「特許請求の範囲2。」に記載の方法において、該第1の化合物は担体もしくはステロイドと結合している蛋白質である。

20. 「特許請求の範囲2。」に記載の方法において、該第1の化合物はレクテンである。

# 特開昭59-224564(2)

て、該第1の化合物は抗体である。

9. 「特許請求の範囲1。」に記載の方法において、該第1の化合物は抗原である。

10. 「特許請求の範囲1。」に記載の方法において、該第1の化合物は蛋白質である。

11. 「特許請求の範囲1。」に記載の方法において、該第1の化合物はアルカリホスファターゼである。

12. 「特許請求の範囲1。」に記載の方法において、該第1の化合物はグリコシダーゼである。

13. 「特許請求の範囲1。」に記載の方法において、該第1の化合物は酸ホスファターゼである。

14. 「特許請求の範囲1。」に記載の方法において、該誘導体化合物はビオチンである。

21. 「特許請求の範囲2。」に記載の方法において、該第1の化合物は抗体である。

22. 「特許請求の範囲2。」に記載の方法において、該第1の化合物は抗原である。

23. 「特許請求の範囲2。」に記載の方法において、該第1の化合物は蛋白質である。

24. 「特許請求の範囲2。」に記載の方法において、該第1の化合物はアルカリホスファターゼである。

25. 「特許請求の範囲2。」に記載の方法において、該第1の化合物はグリコシダーゼである。

26. 「特許請求の範囲2。」に記載の方法において、該第1の化合物は酸ホスファターゼである。

27. 「特許請求の範囲2。」に記載の方法において、該第1の化合物はレクテンである。

て、該誘導体化化合物はビオチンである。

28. 「特許請求の範囲 2.」に記載の方法において、該第 2 の化合物はアビジンである。

29. 「特許請求の範囲 2.」に記載の方法において、該第 2 の化合物はストレプトアビジンである。

30. 「特許請求の範囲 1.」に記載の方法において、該固体基材はセファローズ基材であり、該第 1 の化合物がグリコシダーゼで該誘導体化化合物がビオチンであり、該得られた複合体はビオチン化グリコシダーゼである。

31. 「特許請求の範囲 2.」に記載の方法において、該第 1 の化合物はグリコシダーゼであり、該誘導体化化合物がビオチンで該第 2 の化合物がストレプトアビジンであり、該得られた複合体はストレプトアビジン-ビオチン化グリコシ

35. 「特許請求の範囲 34.」に記載の方法において、該競合抑制物質は p-アミノベンジルホスホン酸であり該基材はセルファローズ基材であり、該第 1 の化合物はアルカリホスファターゼであり該誘導体化化合物はビオチンである。

36. 「特許請求の範囲 2.」に記載の方法において、該基材は該第 1 の化合物がある競合抑制物質を介して該基材に付着する前に該第 1 の化合物に対する該競合抑制物質によって前処理される。

37. 「特許請求の範囲 36」に記載の方法において、該競合抑制物質は p-アミノベンジルホスホン酸であり該基材はセルファローズ基材であり、該第 1 の化合物はアルカリホスファターゼであり該誘導体化化合物はビオチンであり、該第 2 の化合物はストレプトアビジンもしくはア

ダーゼである。

32. 「特許請求の範囲 1.」に記載の方法において、該固体基材はガラス基材、変性ガラス基材、ポリスチレン基材、ポリアクリルアミド基材もしくはデキストランゲル又はセファローズ基材である。

33. 「特許請求の範囲 2.」に記載の方法において、該固体基材はガラス基材、誘導化又は変性ガラス基材、ポリスチレン基材、ポリアクリルアミド基材もしくはデキストランゲル又はセファローズ基材である。

34. 「特許請求の範囲 1.」に記載の方法において、該基材は該第 1 の化合物がある競合抑制物質を介して該基材に付着する前に該第 1 の化合物に対する該競合抑制物質によって前処理される。

38. 「特許請求の範囲 1.」に記載の方法において、該複合体は該固体基材に付着している間に第 2 の化合物を含む流動体もしくは混合物に接触もしくは接近せしめられ、該第 2 の化合物は該第 1 の化合物を誘導体化するために用いられる該誘導体化化合物に対して特異的に結合する能力を有し、それによって該第 2 の化合物を含む該流動体もしくは混合物から該第 2 の化合物を抽出もしくは除去する。

39. 活性もしくは機能位を有する第 1 の化合物-該第 1 の化合物は誘導体化化合物により誘導体化もしくは結合されている-および該第 1 の化合物に結合せられている該誘導体化化合物に対して特異的に結合する能力を有する第 2 の化合物とからなることを特徴とする複合体。

40. 「特許請求の範囲 39.」に記載の複合体において、該第 1 の化合物は酵素である。

## 特開昭59-224564(4)

41. 「特許請求の範囲 39.」に記載の複合体において、該第 1 の化合物はホルモンである。

42. 「特許請求の範囲 39.」に記載の複合体において、該第 1 の化合物はホルモン受容体である。

43. 「特許請求の範囲 39.」に記載の複合体において、該第 1 の化合物は担体もしくはステロイドと結合している蛋白質である。

44. 「特許請求の範囲 39.」に記載の複合体において、該第 1 の化合物はレクテンである。

45. 「特許請求の範囲 39.」に記載の複合体において、該第 1 の化合物は抗体である。

46. 「特許請求の範囲 39.」に記載の複合体において、該第 1 の化合物は抗原である。

47. 「特許請求の範囲 39.」に記載の複合体において、該第 1 の化合物は蛋白質である。

48. 「特許請求の範囲 39.」に記載の複合体において、該第 1 の化合物はアルカリホスファターゼである。

49. 「特許請求の範囲 39.」に記載の化合物において、該第 1 の化合物はグリコシダーゼである。

50. 「特許請求の範囲 39.」に記載の複合体において、該第 1 の化合物はグルコースオキシダーゼである。

51. 「特許請求の範囲 39.」に記載の複合体において、該誘導体化化合物はビオチンであり、該第 2 の化合物はアビジンもしくはストレプトアビジンである。

52. 「特許請求の範囲 39.」に記載の複合体において、該第 1 の化合物はアルカリホスファターゼであり、該誘導体化化合物はビオチンであり、該第 2 の化合物はストレプトアビジンもしくはアビジンである。

53. 「特許請求の範囲 39.」に記載の複合体において、該第 1 の化合物は酸ホスファターゼであり、該誘導体化化合物はビオチンであり、該第 2 の化合物はアビジンもしくはストレプトアビジンである。

54. 「特許請求の範囲 39.」に記載の複合体において、該第 1 の化合物はグリコシダーゼであり、該誘導体化化合物はビオチンであり、該第 2 の化合物はストレプトアビジンもしくはアビジンである。

55. 化学的にラベルされたヌクレオチドに、活性もしくは機能位点を有する第 1 の化合物、複

合体の該第 1 の化合物に結合される誘導体化化合物、および該誘導体化化合物に対して特異的に結合する能力を有しそしてそれに結合されている第 2 の化合物とからなる複合体との接触をもたすことと該第 2 の化合物はまた該化学的にラベルされるヌクレオチドを化学的にラベルするために用いられる化学部分に対して結合する能力を有し、それによって該複合体は該ヌクレオチドに結合される該化学的にラベルする部分に結合されるようになる)、そして該化学的にラベルされたヌクレオチドに結合されている該複合体の結果として得られた結合物を該複合体を構成している該第 1 の化合物の活性もしくは機能位点が該基材において観察し得る変化を生成するために有効であるような条件下で基材との接触をもたすことによってその時点で該複合体の該第 2 の化合物に結合されている該化学的にラベルされたヌクレオチドの存在を明らかにすることからなることを特徴とする化学的にラベルされたヌクレオチドを検出する方法。

56. 「特許請求の範囲 55.」に記載の方法において、該ヌクレオチドはデオキシリボヌクレオチドである。

57. 「特許請求の範囲 55.」に記載の方法において、該ヌクレオチドはリボヌクレオチドである。

58. 「特許請求の範囲 55.」に記載の方法において、該化学的にラベルされたヌクレオチドはデオキシリボヌクレオチドであり、該デオキシリボヌクレオチドはあるポリデオキシリボヌクレオチドもしくはあるDNA分子の成分からなる。

59. 「特許請求の範囲 55.」に記載の方法において、該化学的にラベルされたヌクレオチドはリボヌクレオチドであり、該リボヌクレオチドはあるポリリボヌクレオチドもしくはRNA分子の成分からなる。

61. 「特許請求の範囲 55.」に記載の方法において、該化学的にラベルされたヌクレオチドはビオチン化ヌクレオチドであり、該複合体は該第1の化合物としてホースラディッシュペーオキシダーゼ、該誘導体化合物としてビオチン、該第2の化合物としてストレプトアビジンもしくはアビジンからなる。

62. 「特許請求の範囲 55.」に記載の方法において、該化学的にラベルされたヌクレオチドはビオチン化ヌクレオチドであり、該複合体は該第1の化合物としてアルカリホスファターゼ、該誘導体化合物としてビオチン、該第2の化合物としてストレプトアビジンもしくはアビジンからなる。

63. 「特許請求の範囲 55.」に記載の方法において、該化学的にラベルされたヌクレオチドはビオチン化ヌクレオチドであり、該複合体は該第1の化合物として酸ホスファターゼ、該誘導

#### 特開昭59-224564(5)

60. 化学的にラベルされたヌクレオチドに第1の化合物、複合体の該第1の化合物に結合されている誘導体化合物、および該誘導体化合物に対して特異的に結合する能力を有し、そしてそれに結合されている第2の化合物からなる複合体との接触をもたらすこと（該第2の化合物はまた該化学的にラベルされるヌクレオチドを化学的にラベルするために用いられる化学部分に対して結合する能力を有し、それによって該複合体は該ヌクレオチドの該化学的にラベルする部分に結合されるようになり、該第1の化合物は蛍光を発することが出来る）、そして該複合体に結合されている該化学的にラベルされたヌクレオチドの結果として得られた結合物を放射線に対して曝露して該複合体からなる該第1の化合物から蛍光を導き出し、かくして該複合体に結合されている該化学的にラベルされたヌクレオチドの存在を示しもしくは明らかにすることからなることを特徴とする化学的にラベルされたヌクレオチドを検出する方法。

体化合物としてビオチン、該第2の化合物としてストレプトアビジンもしくはアビジンからなる。

64. 化学的にラベルされたヌクレオチドに第1の化合物と第2の化合物とを有する複合体との接触をもたらすこと（該第2の化合物は該第1の化合物に対して特異的に結合する能力を有し、該第2の化合物はフルオレセイン化され、該第1の化合物はまた該化学的にラベルされるヌクレオチドを化学的にラベルするために用いられる該化学部分に関して結合する能力を有し、しかして該複合体は該第1の化合物を介して該核酸の化学的にラベルする部分に結合されるようになる）、そして該複合体の該第1の成分に結合されている該化学的にラベルされたヌクレオチドの結果として得られた結合物を放射線に対して曝露し、それによって該複合体の該第1の化合物に結合されている該第2の化合物は蛍光を導出され、かくして該複合体に結合されてい



る該化学的にラベルされたヌクレオチドの存在を示しもしくは明らかにすることからなることを特徴とする化学的にラベルされたヌクレオチドを検出する方法。

65. 「特許請求の範囲 64.」に記載の方法において、該化学的にラベルされたヌクレオチドはビオチン化ヌクレオチドであり、該第1の化合物はヤギ抗-ビオチン抗体であり、該第2の化合物はフルオレセイン化ウサギ抗-ヤギ抗体である。

66. 「特許請求の範囲 55.」に記載の方法において、該化学的にラベルされたヌクレオチドはグリコシル化ヌクレオチドであり、該複合体は該第1の化合物としてレクチンからなる。

67. 「特許請求の範囲 66.」に記載の方法において、該レクチンはコンカナバリンAである。

69. 抗体を含んでいる物質に、複合体に該抗体との接触をもたらす条件下において該複合体との接触をもたらすこと（該複合体は該抗体と接触した時該抗体と結合するための該抗体に対する抗原、該複合体の該抗原に結合される誘導体化合物、および該誘導体化合物に結合されている第2の化合物からなり、該第2の化合物は該抗体に結合されている該複合体がある基材との接触をもたらされる時、該複合体は該基材において観察可能な変化を生成することが可能であるような活性もしくは官能性位置を有する）、該複合体に該抗体との接触をもたらし該抗原を介して該複合体を該抗体に結合すること、および得られた抗体結合複合体に該基材との接触をもたらし該基材において観察可能な変化をもたらしそれによって該物質中に該抗体が存在していることを明らかにすることからなることを特徴とする抗体を検出する方法。

70. 複合体に接触した時にある抗原に対する結

#### 特開昭59-224564(6)

68. ホルモンを含んでいる物質に、複合体に該ホルモンとの接触をもたらす条件下において該複合体との接触をもたらすこと（該複合体は該ホルモンと接触した時、該ホルモンとの結合に対する活性もしくは機能位置を有するホルモン受容体、該複合体の該ホルモン受容体に結合されているある誘導体化合物、および該誘導体化合物に結合されている第2の化合物とからなり、該第2の化合物は該ホルモンに結合されている該複合体がある基材との接触をもたらされる時、該複合体は該基材において観察されることが出来る変化を生じ得るような活性もしくは機能位置を有する）、該複合体に該ホルモンとの接触をもたらし該複合体を該ホルモン受容体を介して該ホルモンに結合すること、および得られたホルモン結合複合体に該基材との接触をもたらし該基材において観察可能な変化をもたらしそれによって該物質中に該ホルモンが存在することを明らかにすることからなることを特徴とするホルモンを検出する方法。

合のための該抗原に対する抗体、該複合体の該抗体に結合された誘導体化合物、および該誘導体化合物に結合された第2の化合物からなる該複合体に抗体との接触をもたらす条件下において、該抗原を含んでいる物質に該複合体との接触をもたらすこと（該第2の化合物は該抗原に結合されている該複合体がある基材との接触をもたらされる時、該複合体が該基材において観察可能な変化を生ずるような活性もしくは官能性位置を有する）、該複合体に該抗原との接触をもたらして該複合体を該抗体を介して該抗原に結合すること、および得られた抗原結合複合体に該基材との接触をもたらして該基材において観察可能な変化をもたらし、それによって該物質の該抗原の存在を明らかにすることからなることを特徴とする抗原を検出する方法。

#### 3. 発明の詳細な説明

生物学的に活性もしくは官能性を有する化合物の一つもしくはそれ以上を含む複合体は生物学的

特開昭59-224564(7)

に活性もしくは官能性を有する化合物である第1の化合物を該第1の化合物の活性位置が保護されるような条件下においてある固体基材に結合もしくは固定され、その結果該第1の化合物が該固体基材に結合されている間に該第1の化合物をある誘導体化もしくは変性化合物と誘導体化もしくは結合することによって調製される。得られた複合体もしくは複合化された第1の化合物はそれから該固体基材に対する結合から解放されて複合体を得、該複合体は該第1の化合物に結合された誘導体化化合物からなり、該第1の化合物は該固体基材から解放された上でその官能性もしくは生物学的活性位置が利用可能になる。例えばアルカリホスファターゼは例えば、望ましくはパラアミノベンジルホスホン酸(P-ABPA)のようなアルカリホスファターゼに対する競合阻害物質のような配位子を通してデキストランビーズのような固体基材に付着される。該デキストランビーズはまず(P-ABPA)で処理され、そしてこのようにして処理されたデキストランビーズにアルカリホ

即ちビオチンと結合しそしてかくして生成されたアビジン-ビオチン化アルカリホスファターゼ複合体はその後離される。例えばアビジン-ビオチン化アルカリホスファターゼよりなる複合体のような複合体は例えばビオチン化ヌクレオチドもしくはビオチン化DNAのようなビオチン化合物のような他の化合物の固定および/または位置決めのための検出システムにおける検出子として用いられ得るであろう。

酵素は診断化学物質もしくは道具として現実にそして大きな可能性のある用途を有している。例えばアルカリホスファターゼのような酵素をビオチン基と接触することによりビオチン化すること、そして得られたビオチン化酵素を例えば診断学的プローブのようなプローブとして用いることが提案されている。不幸にしてアルカリホスファターゼがビオチン化される時、アルカリホスファターゼである酵素の酵素活性の約70%が最終的に損失となることが見出されている。本質的にそれは例

スファターゼが接触をもたられる。該競合阻害物質は該アルカリホスファターゼの活性位置を占めるとともに同時に保護を行なっている間に該アルカリホスファターゼがデキストランビーズに結合するための配位子としての役目をする。それによってかくして結合されたアルカリホスファターゼは例えばビオチン化によって誘導体化もしくは変性される。アルカリホスファターゼのビオチン化に続いて、得られたビオチン化アルカリホスファターゼはそれが固定されているP-ABPA処理固体基材もしくはデキストランビーズに対する結合から離されもしくは移され、完全なアルカリホスファターゼとしての活性もしくは官能性位置を有するビオチン化アルカリホスファターゼを得る。該複合体はまだデキストランビーズに付着している間にもし所望ならばアビジンとの接触によるようなある活性もしくは官能性位置を有する第2の化合物もしくは成分によって更に処理されることが出来、そして該処理によればビオチン化アルカリホスファターゼの変性化もしくは誘導体化部分、

例えば酸ホスファターゼおよびグリコシダーゼのような他の酵素の一般的な誘導体化もしくは変性もしくはビオチン化に関しては真実であろう。例えばアルカリホスファターゼのような酵素の活性化されたビオチン(N-ヒドロキシサクシニド-ビオチン)によるビオチン化において、ビオチン化は該酵素の反応位置で、もしくはその近傍でリシン残基のイプシロンアミノ基を介して起ることは明らかになっている。同様にまたビオチンの結合は完全な酵素活性のために重要である酵素の第三次構造を分裂させることは明らかになっている。結局例えばビオチン化のような例えばアルカリホスファターゼのような酵素の直接変性もしくは誘導体化は診断学的目的もしくは他の目的に対して有用なビオチン化されたアルカリホスファターゼのような満足に誘導体化された酵素を得ることはなかった。

本発明の一つの目的は例えばアルカリホスファターゼ、酸ホスファターゼのような酵素のビオチ



ン化のような機能もしくは生物学的活性化合物の変性もしくは誘導体化、および他の酵素、もしくはビオチン化もしくは他のもしくは同様な変性もしくは誘導体化が可能な生物学的官能性もしくは活性化合物の変性もしくは誘導体化に対する改良された方法を提供することにある。

本発明の他の目的は例えば他の物質の位置決定もしくは同定もしくは測定に関連して、診断学的目的のために本来有用なビオチン化アルカリホスファターゼもしくは酸ホスファターゼのような変性もしくは誘導体化活性もしくは官能性化合物を提供することにある。

本発明の他の目的は容易にそれ自体結合したまたはビオチンもしくはアビジン部分もしくは他の生物学的活性もしくは官能性化合物もしくは複合体と容易に結合される化合物の調製に有用な材料および手法を提供することにある。

性位置が保護される条件下においてある固体基材に結合もしくは固定すること、このように該第1の化合物が該固体基材に結合されている間に該第1の化合物は誘導体化もしくは変性化合物によって誘導体化もしくは結合することによって得られる。得られた複合体もしくは複合体化された第1の化合物はそれから該固体基材に対する結合から解放されて複合体を得、該複合体は該第1の化合物に結合されている誘導体化化合物と該第1の化合物とからなり、該固体基材から解放されてその官能性もしくは生物学的活性位置が使用可能となる。例えば、アルカリホスファターゼはデキストランビーズのような固体基材に対して、望ましくはアルカリホスファターゼに対する競合阻害物質、p-アミノベンジルホスホン酸(P-ABPA)のような配位子を介して固体基材に結合せられる。該デキストランビーズは最初にP-ABPAによって処理されそしてアルカリホスファターゼはこのようにして処理されたデキストランビーズとの接触をもたせられる。該競合阻害物質P-ABPAは

#### 特開昭59-224564(8)

本発明の実施の一つの特別な例においては酵素を基礎としたもしくは結合された材料とこのような材料の調製および診断学的プローブ等のような物質の利用のための手法が提供される。

本発明に付随する他の目的は次にかゝる詳細な説明に照らして明らかにされるであろう。本発明の実施の少なくとも一つの実施例において、前述の少なくとも一つの目的が果されるであろう。

例えば酵素、神経ホルモンを含むホルモン、レクチン、抗体、抗原、例えばステロイド結合蛋白質のような蛋白質、ホルモン受容体等のような官能性化合物もしくは生物学的活性化合物の変性もしくは誘導体化のための改良された方法もしくは手法が提供される。例えば生物学的に活性もしくは官能性化合物の一種もしくは二種以上もしくは生物学的に活性もしくは官能性位置を含む複合体のような複合体は生物学的に活性もしくは官能性化合物である第1の化合物を該第1の化合物の活

アルカリホスファターゼの活性位置を同時に占めそして保護している間にアルカリホスファターゼを該デキストランビーズに接触させるための配位子としての役目をする。それによって、かくして結合されたアルカリホスファターゼは例えばビオチン化によるような誘導体化もしくは変性される。該アルカリホスファターゼをビオチン化した上で、得られたビオチン化アルカリホスファターゼは固定されている該P-ABPA処理固体基材もしくはデキストランビーズに対する結合から離されもしくは取除かれ、アルカリホスファターゼ本来の官能性位置の活性を有するビオチン化アルカリホスファターゼを得る。デキストランビーズにまだ結合している間、該複合体はある第2の化合物もしくは成分によって更に処理されるが、該第2の化合物もしくは成分はまた例えばもし所望なればビオチン化アルカリホスファターゼの変性され、もしくは誘導体化された部分、即ちビオチンと結合するであろうアビジンとの接触によって活性もしくは官能性位置を有し、かくして生成されたアビ

ジナービオチン化アルカリホスファターゼ複合体はその後離される。アビジン-ビオチン化アルカリホスファターゼからなる複合体のようなこの複合体はビオチン化ヌクレオチドもしくはビオチン化DNAのようなビオチン化された化合物のような他の化合物の同定および/または位置決めのための検出システムにおいて検出子として用いられることが出来るであろう。

より特殊には、そして例えばアルカリホスファターゼのような酵素のビオチン化に対して適用されるような本発明の実施の強調によって、例えばアルカリホスファターゼのような酵素のビオチン化のための改良された方法もしくは手法は酵素の競合阻害物質を固体基材、望ましくは粒子状の基材に固定することによって与えられる。それによって、該酵素はかくして固定された競合阻害物質との接触をもたられそのようにして該阻害物質は酵素活性位置と相互作用を行なうかもしくはその位置を効果的に占める。該阻害物質による該酵

本発明の実施は酵素、特に活性化されたビオチン、N-ハイドロキシサクシンイミド-ビオチンと反応する酵素のようなビオチン化され得る能力を有する酵素に対して広く適用され得る。このように適当な酵素はアルカリホスファターゼおよび酸ホスファターゼのみでなく、例えばβ-ガラクトシダーゼおよびグルコースオキシダーゼのようなグルコシダーゼを含む他の酵素をも含むものである。

上記に示されたように、該酵素のビオチン化は該酵素を活性化ビオチン、N-ハイドロキシサクシンイミド-ビオチンと接触させもしくは反応させることによって容易にもたられる。しかしながら他の手法が酵素のビオチン化をもたらしために有用でありそしてビオチン化酵素を生成するこのような手法のすべては本発明の実施において有用である。

本発明の実施において、ビオチン化されるべき

特開昭59-224564(9)

素活性位置の占有は該酵素の続いて起るビオチン化の間、該酵素、即ち該酵素活性位置を保護する役目をする。このようにして占められた該酵素の活性位置によって、該酵素はその時点で基材に結合されている阻害物質に結合されそして例えば活性化ビオチン、N-ハイドロキシサクシンイミド-ビオチンと接触もしくは反応することによってビオチン化される。この操作において該酵素はビオチン化されるかもしくはビオチンまたは該酵素に結合されているビオチン部分を与えられる。

それによって該酵素のビオチン化の後、得られたビオチン化酵素は得られた生成物とともに基材に残存し固定されている阻害物質から離され、そして実質的に影響されないその反応位置を有するビオチン化酵素の回収を行なう。例えばビオチン化アルカリホスファターゼのようなビオチン化酵素は一般に多くの化学的および/または診断学的方法において有用である。

酵素は先ず競合阻害物質との接触をもたられ、それによってその後のビオチン化の操作の間酵素の反応もしくは活性位置を一時的におよび/または保護するように占有する。該酵素との接触がもたられるに先立って該阻害物質は先ず望ましくは基材に固定、付着もしくは結合せられる。示されるように、該基材は固体基材もしくは粒子状固体基材に固定せられるであろう。固定基材はガラス表面もしくは塗膜、ポリアクリルアミド表面もしくは塗膜、もしくは誘導体化ガラス表面もしくは塗膜、デキストランゲル(セファローズ)表面もしくは塗膜、もしくはポリスチレン表面もしくは塗膜が存在するかもしくは有するものである。本発明の実施において特に望ましいものはこのような表面を有するかもしくはこのような表面が存在する例えばセファローズビーズのようなビーズのごとき粒状固形材料であろう。このような表面に対する阻害物質の固定は該阻害物質にこのような表面との接触がもたらされた時実質的に容易に起る。

後続のビオチン化操作の間該酵素の活性もしくは反応位置を保護するために用いられる阻害物質に関して、酵素に対する既知の競合阻害物質のいかなるものも有利に用いられる。アルカリホスファターゼの場合には、このような阻害物質は1-アミノ-アントラキノンのジアゾニウム塩、4-ベンゾリミノ-2:5-ジメトキシ-アニリン、p-ニトロアニリン、4-クロロ-2-ニトロアニリン、2:5-ジクロロアニリン、o-ジアニシジン、4-クロロ-o-アニシジン、5-ニトロ-o-アニシジン、5-クロロ-o-トルイジン、4-ニトロ-o-アニシジン、3-ニトロ-p-トルイジン、3-ニトロ-p-アニシジン、4-アミノ-3:1'-ジメチルアゾベンゼン、4-アミノ-2:5-ジメトキシ-4-ニトロアゾベンゼン、4-アミノ-4'-メトキシジフェニルアミン、3-ニトロ-o-トルイジン、4-アミノ-4'-ニトロ-3:6-ジメトキシアゾベンゼン、4-アミノ-3:1'-ジメチルアゾベンゼン、2-メトキシ-5-ジエチルアミノ-サルファニ

ピラノシド、p-アミノブチル-ベター-D-チオガラクトシド、p-アミノブチル-ベター-D-チオグルコースピラノシドを含む。

前述の他の有用な阻害物及びその関連物に関しては Biochemistry, 1978, 17, No. 5, pp. 915-919; Journal of Clinical Pathology, 1978, 31, pp. 454-460; and Biochimia et Biophysica Acta, 1979, 569, pp. 159-176 に述べてある。

適当な基材と酵素に対して固定されている阻害物質によって占められている活性もしくは反応位置を有することによって酵素が保護された後、このような保護されたものは例えばN-ハイドロキシサクシンイミド-ビオチン(NHS-ビオチン)のような活性化ビオチンによる接触によってビオチン化され、該ビオチン化操作は約6~7のpH範囲で行われ、得られたビオチン化酵素はその後阻害物質から解放もしくは分離される。該固

特開昭59-224564(10)

リン、2-ベンゾルアミノ-4-メトキシ-トルイジン、4-アミノ-ジフェニルアミン、p-ジアミノ-ジフェニルアミンを含む。例えば酸ホスファターゼのような他の酵素に対する阻害物質に関しては、このような阻害物質はベンジルホスホン酸、フェニルホスホン酸、2-フェニルエチルホスホン酸、エチルホスホン酸、p-ニトロベンジルホスホン酸、p-クロロベンジルホスホン酸、p-アミノベンジルホスホン酸、p-アミノフェニルホスホン酸、シクロヘキシルメチルホスホン酸、フェニルアルソン酸、p-アミノフェニルアルソン酸およびホスホン酸のようなホスホン酸及びアルソン酸を含む。グリコシダーゼ及びグリコースオキシダーゼのような他の酵素に関して有用な阻害物はp-アミノフェニル-ベター-D-チオガラクト-ピラノシド、p-アミノフェニル-ベター-D-グルコース-ピラノシド、3-アミノサクシニル-3'-アミノジプロピラミン-ベター-D-チオガラクト-ピラノシド、p-アミノプロピラミン-ベター-D-チオガラクト

定されている阻害物質に対する結合から該ビオチン化酵素を解放もしくは分離することは例えば該酵素に対するベンジルホスホン酸の親和性に対して競合する増加されたもしくは濃縮された磷酸イオンを含むバッファー中でpHを約9に増加させることによって容易に行われる。

本発明の実施の特別な例を介して、アルカリホスファターゼ水溶液は例えばp-アミノベンジルホスホン酸(p-ABPA)のようなアルカリホスファターゼ阻害物質活性の競合阻害物質が付着もしくは固定されているデキストランゲルビーズ、セファローズとの接触をもたせられる。該固定されているp-ABPAによる該アルカリホスファターゼの接触の上で、セファローズビーズに対して固定されている該p-ABPAのベンジルホスホン酸部分は後に続くビオチン化のような後に続く置換からそれを保護する酵素活性位置と相互作用もしくは該位置を占有する。該酵素アルカリホスファターゼの反応位置はかくしてセファローズ固定

p-ABPAに占有されもしくは結合され、活性化ビオチン、N-ヒドロキシサクシンイミド-ビオチンの水溶液は例えば pH 6~7 において酵素との接触をもたられる。これらの条件下において、該ビオチンは酵素、アルカリホスファターゼの例えばアミノ基もしくは蛋白質部分で結合もしくは付着するであろう。その結果得られたビオチン化酵素はビオチン化酵素をそれから洗い出すかもしくは離すこと、pHを約9に増加させること、および燐酸イオンの段々に濃縮した溶液を用いることによって固定されている阻害物質との結合から取除かれる。分離そして分離物からの回収の後、例えばビオチン化アルカリホスファターゼのような結果として得られた分離されたビオチン化酵素は反応性ビオチン位置と結合しているかもしくはその位置を利用出来るのでプローブとして使用することが可能である。

本発明によるビオチン化酵素の特別な手法と応用はアビジンもしくはストレプトアビジンを含む

得られたビオチン化酵素はこの時点でそのビオチン部分に結合しているアビジンもしくはストレプトアビジンを有し、該固定されている阻害物質に対する接触から離されもしくは取除かれ、そして例えばアルカリホスファターゼのような酵素からなる酵素複合体が回収され、該酵素複合体はビオチン化されており、そしてこの時点で該ビオチン化酵素のビオチン部分に付着もしくは結合されている更に付加されたアビジンもしくはストレプトアビジンを有するであろう。この手法は、示されるように、これらを含んでいる不純物質からアビジンもしくはストレプトアビジンの精製および回収のための容易な方法を提供する。更にこの手法はまた前記したように酵素、これに結合するビオチンおよび既に酵素に固定されているビオチン部分に結合されているアビジンおよびストレプトアビジンからなる酵素複合体を与える手段を提供する。

この酵素-ビオチン-アビジンもしくはストレ

特開昭59-224564(11)

混合液もしくは比較的純な物質からのアビジンおよび/またはストレプトアビジンの回収のために該ビオチン化酵素を用いることであろう。アビジンおよびストレプトアビジンはビオチンと強く結合する。本発明の実施の見地において、例えばビオチン化アルカリホスファターゼのようなビオチン化酵素は該固定されている阻害物質から分離もしくは単離もしくは遊離されずに、むしろ固定された阻害物質にまだ結合している間に該ビオチン化酵素はアビジンもしくはストレプトアビジンを含む混合物との接触をもたられるであろう。アビジンもしくはストレプトアビジンを含む材料が効果的に固定されているビオチン化酵素との接触をもたられる時、ビオチンとアビジンもしくはストレプトアビジンの間の強い結合親和性のために、該アビジンもしくはストレプトアビジンはアビジンもしくはストレプトアビジンがこれらを含んでいる物質から取除かれもしくは引きはがされる結果によって該効果的に固定されたビオチンと反応もしくは結合されるであろう。その結果、

ストアビジン複合体は例えばビオチン化DNA、ビオチン化ペプチドもしくは蛋白質、ビオチン化抗原および/またはビオチン化抗体のようなビオチン化基質を探索、同定、検出、もしくは位置決めプローブとして特に有用であろう。この応用において、例えばビオチン化DNAのようなビオチン化基質の位置もしくは存在は、ビオチン化基質にアルカリホスファターゼのような酵素からなり、順番に酵素、アビジンもしくはストレプトアビジンに固定されるビオチン部分に結合されたビオチンに結合されている酵素複合体との接触をもたすことによって測定されるであろう。アビジンもしくはストレプトアビジンはビオチンに対して強い結合親和性を有するので、該酵素複合体はビオチン化基質に対する曝露もしくは接触の上で例えばビオチン化DNAのようなビオチン化基質のビオチン部分に固定されている酵素複合体、酵素-ビオチン-アビジンもしくはストレプトアビジンを結果として得ると云うことによって容易に固定されるようになる。ビオチン化DNA基質の位置

決めもしくは存在もしくは測定はその後利用可能に残存している該酵素の反応位置から教えられもしくは明らかにされる適当な化学反応もしくは物理的証明によって証明もしくは明らかにされる。

本発明の実施の更なる説明および記述を介して、そして酵素、特にアルカリホスファターゼ、酸ホスファターゼおよびホルモン受容体パーオキシダーゼのような酵素の誘導体化に対する本発明の実施の適用可能性を更に強調して、生物活性もしくは官能性複合体、特にアルカリホスファターゼ-ビオチン-ストレプトアビジンからなる複合体の合成を明らかにする本発明の実施例を以下にあげる。

#### 実施例 1

アルカリホスファターゼ-ビオチン-ストレプトアビジン複合体

アルカリホスファターゼ-ビオチン-ストレプトアビジン複合体の調製において、アルカリホス

3回変えられた。

透析されたアルカリホスファターゼの1 mlがSeph-p-ABPAの25% スラリーの4 mlに対して添加されそして室温で約30分間回転機中で充分混合された。その上で、該ゲルは小さいカラムの中へ導びかれそして再循環されることが出来る遊離酵素として流出物中から採集された。該ゲルはそれからpH 8の冷0.10MトリスHClバッファの10容量で洗滌された。該ゲルはそれから低速の連続過流撹拌を行ないつゝ0.6 mlの無水ジメチルスルホキサイドを滴加された0.01MトリスHClバッファの1 ml中に再分散された。続いて、同様な方法で0.005M NHS-C<sub>7</sub>-ビオチンの178マイクロリッターが添加されそして得られた混合物は回転機中で1.5時間室温にて孵置された。

孵置期間の終りにて、pH 8.0の冷0.01MトリスHClの45 mlが添加せられ、得られ

#### 特開昭59-224564(12)

ファターゼ、mlゲルマトリクスに対して0.7mgアルカリホスファターゼの容量を有する架橋6%ビーズ化アガロース上の不動態化されたp-アミノベンジルホスホン酸(p-ABPA)、ビオチン化合物NHS-C<sub>7</sub>-ビオチン、分子量約471, 0.005M 無水ジメチルスルホキサイド溶液、約10.2mg/ml蛋白質の濃度のストレプトアビジン、pH 8.0の0.01MトリスHCl、およびpH 8.0の0.01MトリスHCl中の0.01M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>をそれに関連する試薬として有利に用いられる。

これら試薬を用いる複合体の調製において、セファローズ-p-アミノベンジルホスホン酸(Seph-p-ABPA)の50% スラリーの2 mlはpH 8で0.01MトリスHClの10容量で平衡化された。アルカリホスファターゼの1mg/mlの濃度を有する溶液およびストレプトアビジンの10mg/mlの濃度の溶液はpH 8.0の0.01MトリスHClに対して4℃、24時間透析せしめられた。この操作において、該バッファの容量は

た混合液は充分に撹拌された。4℃約30分間の放置後、上澄みを取除く、この洗滌操作は二回あるいはそれ以上繰返された。得られた処理されかつ洗滌されたゲルは取出されそして1 mlの透析されたストレプトアビジンが加えられたpH 8.0の0.01MトリスHClの1 mlバッファ中に再分散され、次いで37℃、30分間の撹拌および孵置が行われた。該孵置期間の終りにて、該ゲルは小さいカラムの中へ充たされそして流出物は遊離ストレプトアビジンとしてそれから採集せられ所望ならば再循環せしめることが出来る。

該カラム中の該ゲルはpH 8.0の0.01MトリスHClの10容量でそれから洗滌せられそして得られたアルカリホスファターゼ-ビオチン-ストレプトアビジン複合体はpH 8.0の0.01MトリスHClバッファ中の0.01M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>と共にカラムから流出した。この操作において5滴のフラクションが採集された。各フラクションは各々のフラクションの10μl、バッファの40



$\mu\text{l}$  および pH 9.0 の 10 % ジエタノールアミンバッファー中の 200  $\mu\text{l}$  の p-ニトロフェニルホスフェイト (1 mg/ml) をとりそして室温で約 10 分静置し、得られた溶液を OD 405 nm で読みとることによって検定された。酵素活性を示すフラクションは集められそしてビオチン化チトクローム C の小量点が点着せられているニトロセルロース紙に塗布された。このようにして調製された複合体は NBT-BCIP 基質を用いてビオチンの 100 f モルを検出することが出来そして螢光獲得基質、フラボン-3-ジホスフェイトを用いて 1 f モルの検出が可能であった。

本実施例は本発明の実施による生物学的活性もしくは官能性化合物の調製を説明するのみならず非常に鋭敏な感度とこのようにして得られた複合体の実際の利用をも示すものである。

#### 実施例 2

##### アルカリホスファターゼ-ビオチン ストレプト

れた。そこで PBS 中の 1 % BSA - 0.1 % ツイン 20 界面活性剤中に希釈された該調製された複合体が加えられ穏やかな揺動によって約 1 時間 37 °C で静置され、次いで各々の洗滌時間 5 分間で PBS 中 1 % BSA 中の 0.1 % ツイン 20 界面活性剤で三回の洗滌が行われ、次いで 10 mM トリス HCl による洗滌が行われた。得られた試験ニトロセルロース紙に対して基質 NBT-BCIP-ペロナールが添加されそして 37 °C で静置され、スポットされたマウス IgG は展開されそしてかくして調製された複合体によって検出された。

前記したように本発明の実施は複合体がビオチン化アルカリホスファターゼのようなビオチン化酵素のような酵素からなる本発明による複合体の調製に関して強調されて来た。しかしながら前記したように、本発明の実施は例えば競合酵素阻害物質が固体マトリクス上で不動態化されているような酸ホスファターゼ、グリコシダーゼ、もしくはいかなる種類の酵素のような他の酵素に対して

#### 特開昭 59-224564 (13)

##### トアビジン-ビオチン-抗体複合体の調製

アルカリホスファターゼ-ビオチン-ストレプトアビジンからなる複合体が実施例 1 で述べられたと同様な方法で調製された。該複合体を含むカラムは pH 8.0 の 10 M トリス HCl で洗滌されそしてその上へ 10 mM の pH 8.0 トリス HCl 中 3 mg/ml の濃度のビオチン化 (B7) -ヤギ抗マウス抗体 IgG の 0.05 ml が該カラムスラリーに添加されそして穏やかな揺動により 37 °C 1 時間静置された。その結果、該複合体は pH 8.0 の 10 mM トリス HCl バッファーによって広範囲にわたって洗滌されそして該カラムの中へ戻された。該カラム内容物はそれから pH 8.0 の 10 mM トリス HCl 中の 10 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  で流出される。該流出物のフラクションは回収され次のように試験された。

マウス IgG はニトロセルロース紙上にスポットされそして空気乾燥され PBS 中 0.5 % ツイン 20 界面活性剤によって 30 分間 37 °C で閉鎖さ

も適用可能である。更に変性もしくは誘導体化成分もしくは化合物はビオチンが望ましいけれども、誘導体化もしくは変性化合物はまたグリコシル基を誘導体化もしくは変性されるべき化合物に対して供与する化合物もしくは成分もまた用いられることが出来る。例えば本発明の実施において、本発明による化合物はグリコシル基もしくは他の糖部分との結合によって変性されるであろう。かくして変性もしくは誘導体化された複合体はそれから例えばアビジンそれ自体がビオチン基もしくはビオチン化合物のビオチン部分に結合するような仕方で、それ自体がグリコシル基に結合している例えばコンカナバリン A のようなレクチンと反応せしめられる。

酵素に対する付加における合併した開示から明らかなように、神経ホルモンを含むホルモン、ホルモン受容体、レクチン、抗原、抗体、蛋白質のような他の生物学的活性の官能性化合物はここに述べられていると同様な方法で変性され広範囲



な用途を有する生物学的活性もしくは官能性複合体の構成に用いられる。例えば、本発明の実施により適当に調製された複合体はその関連する抗原もしくは抗体を探し出しそしてそれに固定する抗体もしくは抗原を一個の末端位置に持つ複合体、その関連するホルモン受容体を探し出しそれに結合するようになるホルモン、グリコシル化合物を探し出しそれに結合するレクチンを含むことが出来る。該複合体の他の末端位置は適当な基質の存在において有効な酵素のような適当な信号部分を含み色信号もしくは他の化学的もしくは物理的変化もしくは蛍光を与えそれによって複合体の他の末端にターゲットが結合していることを知らせる。例えば、該複合体の他の末端がホルモンである時、複合体は関連するホルモン受容体に対して、例えばそれを含んでいる組織中で探し出すためにもしくはプローブとして用いられる。ホルモン受容体に結合されている複合体のホルモン末端によって該複合体の他端に提供されている酵素は前記したように該複合体のホルモン末端部分がホルモ

特開昭59-224564(14)

ン受容体に位置および／または結合していることを知らせるために用いられるであろう。同様な方法で、該複合体は抗体、抗原、ステロイド、グリコシル化有機分子、ビオチン化分子もしくは基質等前記したような関心のある他のターゲットを探し出すために用いられ得る。

上述の開示に照らして述べられた技術で明きらかなように、本願の実施にあたっては多くの変更、改変および置き換えが可能であり、これらは本願の精神及び範囲から離れるものではない。

特許出願人 エンゾー バイオケム、  
インコーポレイテッド

代理人 宇佐見 忠男

